

RECORD COPY

**INTERNATIONAL APPLICATION
UNDER THE
PATENT COOPERATION TREATY**

REQUEST

**THE UNDERSIGNED REQUESTS THAT THE PRESENT
INTERNATIONAL APPLICATION BE PROCESSED
ACCORDING TO THE PATENT COOPERATION TREATY**

22 Rec'd PCT/PTO 2 n JUL 1992

(The following is to be filled in the receiving Office)

**INTERNATIONAL
APPLICATION No.:** PCT/SE 91/00892

**INTERNATIONAL
FILING DATE:** 1991 -12- 20

The Swedish Patent Office
(Stamp) PCT International Application
Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(indicated by applicant if desired) 2912327

Box No. I TITLE OF INVENTION

**GENETICALLY ENGINEERED MODIFICATION OF POTATO TO FORM
AMYLOPECTIN-TYPE STARCH**

**Box No. II APPLICANT (WHETHER OR NOT ALSO INVENTOR); DESIGNATED STATES FOR WHICH HE/SHE/IT
IS APPLICANT.** Use this box for indicating the applicant or, if there are several applicants, one of them. If more than one person
(includes, where applicable, a legal entity) is involved, continue in Box No. III.

The person identified in this box is (mark one check-box only): ☐ applicant and inventor * ☒ applicant only

Name and address: **

AMYLOGENE HB
c/o SVALÖF AB
S-268 81 SVALÖV
Sweden

Telephone number (including area code): Telegraphic address: Teleprinter address:

State of nationality: Sweden State of residence: * Sweden

The person identified in this box is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the "Supplemental Box"

**Box No. III FURTHER APPLICANTS, IF ANY; (FURTHER) INVENTORS, IF ANY; DESIGNATED STATES FOR
WHICH THEY ARE APPLICANTS (IF APPLICABLE).** A separate sub-box has to be filled in in respect of each person (includes,
where applicable, a legal entity). If the following two sub-boxes are insufficient, continue in the "Supplemental Box," (giving there for
each additional person the same indications as those requested in the following two sub-boxes) or by using a "continuation sheet."

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only): ☒ applicant and inventor * ☐ applicant only ☐ inventor only *

Name and address: **

HOFVANDER, Per
Doppinggränd 8
S-230 11 FALSTERBO
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant* (or *applicant and inventor*), indicate also:

State of nationality: Sweden State of residence: * Sweden

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only): ☒ applicant and inventor * ☐ applicant only ☐ inventor only *

Name and address: **

PERSSON, Per T.
Travgatan 9
S-291 65 KRISTIANSTAD
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant* (or *applicant and inventor*), indicate also:

State of nationality: Sweden State of residence: * Sweden

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the "Supplemental Box"

* If the person indicated as "applicant and inventor" or as "inventor only" is not an *inventor* for the purposes of all the designated States, give the necessary indications in the "Supplemental Box."

** Indicate the name of a natural person by giving his/her family name first followed by the given name(s). Indicate the name of a legal entity by its full official designation. In the address, include both the postal code (if any) and the State (name).

*** If residence is not indicated, it will be assumed that the State of residence is the same as the State indicated in the address.

P180

Box No. III CONTINUATION, IF REQUIRED) FURTHER APPLICANTS, IF ANY, AND FURTHER INVENTORS, IF ANY; DESIGNATED STATES FOR WHICH THEY ARE APPLICANTS (IF APPLICABLE). A separate sub-box has to be filled in in respect of each person (includes, where applicable, a legal entity).

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only):

☒ applicant and inventor *

☐ applicant only

☐ inventor only *

Name and address: **

TALLBERG, Anneli
Drapavägen 69
S-223 74 LUND
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant* (or *applicant and inventor*), indicate also:

State of nationality:

State of residence: ***

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only):

☒ applicant and inventor *

☐ applicant only

☐ inventor only *

Name and address: **

WIKSTRÖM, Olle
Wasagatan 1
S-291 53 KRISTIANSTAD
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant* (or *applicant and inventor*), indicate also:

State of nationality: Sweden

State of residence: ***

Sweden

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only):

☐ applicant and inventor *

☐ applicant only

☐ inventor only *

Name and address: **

If the person identified in this sub-box is *applicant* (or *applicant and inventor*), indicate also:

State of nationality:

State of residence: ***

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only):

☐ applicant and inventor *

☐ applicant only

☐ inventor only *

Name and address: **

If the person identified in this sub-box is *applicant* (or *applicant and inventor*), indicate also:

State of nationality:

State of residence: ***

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the "Supplemental Box"

* If the person indicated as "applicant and inventor" or as "inventor only" is not an *inventor* for the purposes of all the designated States, give the necessary indications in the "Supplemental box."

** Indicate the name of a natural person by giving his/her family name first followed by the given name(s). Indicate the name of a legal entity by its full official designation. In the address, include both the postal code (if any) and the State (name).

*** If residence is not indicated, it will be assumed that the State of residence is the same as the State indicated in the address.

If this continuation sheet is not used, it need not be included in the Request.

Box No. IV AGENT (IF ANY) OR COMMON REPRESENTATIVE (IF ANY); ADDRESS FOR NOTIFICATIONS (IN CERTAIN CASES). A common representative may be appointed only if there are several applicants and if no agent is or has been appointed; the common representative must be one of the applicants.
The following person (includes, where applicable, a legal entity) ~~is hereby~~ has been appointed as agent or common representative to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities:

Name and address, including postal code and country:

If the space below is used instead for an address for notifications, mark here: ☐

AWAPATENT AB
Box 5117
S-200 71 MALMÖ
Sweden

Telephone number (including area code):

+46 40 71620

Telegraphic address:

awapatent malmoe

Teleprinter address:

32407 awapat S

Box No. V DESIGNATION OF GROUPS OF STATES OR STATES⁽¹⁾; CHOICE OF CERTAIN KINDS OF PROTECTION OR TREATMENT. The following designations are hereby made (please mark the applicable check-boxes):

Regional Patent

☒ **EP European Patent⁽²⁾:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IT Italy, LU Luxembourg, NL Netherlands, SE Sweden, MC Monaco
and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

☒ **OA OAPI Patent:** Benin, Burkina Faso, Cameroon, Central African Republic, Chad, Congo, Gabon, Mali, Mauritania, Senegal, Togo,
and any other State which is a Contracting State of OAPI and of the PCT: if other OAPI title desired, specify on dotted line⁽³⁾:

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line⁽³⁾)

<input checked="" type="checkbox"/> AT Austria ⁽³⁾	<input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea ⁽³⁾
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australia ⁽³⁾	<input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka
<input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados	<input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg ⁽³⁾
<input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria ⁽³⁾	<input checked="" type="checkbox"/> MC Monaco ⁽³⁾
<input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil ⁽³⁾	<input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar
<input checked="" type="checkbox"/> CA Canada	<input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi ⁽³⁾
<input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein	<input checked="" type="checkbox"/> NL Netherlands
<input checked="" type="checkbox"/> DE Germany ⁽³⁾	<input checked="" type="checkbox"/> NO Norway
<input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark	<input checked="" type="checkbox"/> PL Poland ⁽³⁾
<input checked="" type="checkbox"/> ES Spain ⁽³⁾	<input checked="" type="checkbox"/> RO Romania
<input checked="" type="checkbox"/> FI Finland	<input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan
<input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom	<input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden
<input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary	<input checked="" type="checkbox"/> SU Soviet Union ⁽³⁾
<input checked="" type="checkbox"/> JP Japan ⁽³⁾	<input checked="" type="checkbox"/> US United States of America ⁽³⁾
<input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea ⁽³⁾	

Space reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after the issuance of this sheet:

⁽¹⁾ The applicant's choice of the order of designations may be indicated by marking the check-boxes with sequential arabic numerals (see also the "Notes to Box No. V").

⁽²⁾ The selection of particular States for a European patent can be made upon entering the national (regional) phase before the European Patent Office (see also the "Notes to Box No. V").

⁽³⁾ If another kind of protection or a title of addition or, in the United States of America, treatment as a continuation or a continuation-in-part is desired, specify according to the instructions given in the "Notes to Box No. V."

R182

Box No. VI PRIORITY CLAIM (IF ANY). The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Country (country in which it was filed if national application; one of the countries for which it was filed if regional or international application)	Filing Date (day, month, year)	Application No.	Office of filing (fill in only if the earlier application is an international application or a regional application)
(1) Sweden	21 December 1990 21.12.1990	9004096-5	
(2)			
(3)			

(Letter codes may be used to indicate country and/or Office of filing)

When the earlier application was filed with the Office which, for the purposes of the present international application, is the receiving Office, the applicant may, *against payment of the required fee*, ask the following:

☒ the receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the above-mentioned earlier application/of the earlier applications identified above by the numbers (insert the applicable numbers) 9004096-5

Box No. VII EARLIER SEARCH (IF ANY). Fill in where a search (international, international-type or other) by the International Searching Authority has already been requested (or completed) and the said Authority is now requested to base the international search, to the extent possible, on the results of the said earlier search. Identify such search or request either by reference to the relevant application (or the translation thereof) or by reference to the search request.

International application number or number and country (or regional Office) of other application:

9004096-5

International/regional/national filing date:

21.12.1990

Date of request for search:

21.12.1990

Number (if available) given to search request:

SE90/00595

Box No. VIII SIGNATURE OF APPLICANT(S) OR AGENT


Ingrid Wiklund

If the present Request form is signed on behalf of any applicant by an agent, a separate power of attorney appointing the agent and signed by the applicant is required. If in such case it is desired to make use of a general power of attorney (deposited with the receiving Office), a copy thereof must be attached to this form.

Box No. IX CHECK LIST (To be filled in by the Applicant)

This international application contains the following number of sheets:

- | | |
|----------------|-------------|
| 1. request | ✓ 4 sheets |
| 2. description | ✓ 31 sheets |
| 3. claims | ✓ 2 sheets |
| 4. abstract | ✓ 1 sheet |
| 5. drawings | ✓ 6 sheets |
| Total | ✓ 44 sheets |

Figure number 2 of the drawings (if any) is suggested to accompany the abstract for publication.

This international application as filed is accompanied by the items marked below:

- ☒ separate signed power of attorney 3 st
- ☐ copy of general power of attorney
- ☐ priority document(s) (see Box No. VI)
- ☐ receipt of the fees paid or revenue stamps
- ☒ cheque for the payment of fees
- ☐ request to charge deposit account
- ☒ other document (specify) fee calculation sheet
- ☒ x copy of official letter

(The following is to be filled in by the receiving Office) 9. ITS-Search Report

- Date of actual receipt of the purported international application: 1991 -12- 20
- Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:
- Date of timely receipt of the required corrections under Article 11 of the PCT:
- Drawings ☒ Received ☐ No Drawings

(The following is to be filled in by the International Bureau)

Date of receipt of the record copy: 20 JANUARY 1992 (20.01.92)

INTERNATIONAL APPLICATION
UNDER THE
PATENT COOPERATION TREATY
REQUEST

THE UNDERSIGNED REQUESTS THAT THE PRESENT
INTERNATIONAL APPLICATION BE PROCESSED
ACCORDING TO THE PATENT COOPERATION TREATY

(The following is to be filled in by the receiving Office)
INTERNATIONAL
APPLICATION No.:

INTERNATIONAL
FILING DATE:

(Stamp)

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(indicated by applicant if desired)

2912327

Box No. I TITLE OF INVENTION

GENETICALLY ENGINEERED MODIFICATION OF POTATO TO FORM
AMYLOPECTIN-TYPE STARCH

Box No. II APPLICANT (WHETHER OR NOT ALSO INVENTOR); DESIGNATED STATES FOR WHICH HE/SHE/IT
IS APPLICANT. Use this box for indicating the applicant or, if there are several applicants, one of them. If more than one person
(includes, where applicable, a legal entity) is involved, continue in Box No. III.

The person identified in this box is (mark one check-box only):

☐ applicant and
inventor *

☒ applicant
only

Name and address: **

AMYLOGENE HB
c/o SVALÖF AB
S-268 81 SVALÖV
Sweden

Telephone number (including area code): Telegraphic address:

Teleprinter address:

State of nationality: Sweden

State of residence: * Sweden

The person identified in this box is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

☐ all designated
States

☒ all designated States except
the United States of America

☐ the United States
of America only

☐ the States indicated
in the "Supplemental Box"

Box No. III FURTHER APPLICANTS, IF ANY; (FURTHER) INVENTORS, IF ANY; DESIGNATED STATES FOR
WHICH THEY ARE APPLICANTS (IF APPLICABLE). A separate sub-box has to be filled in in respect of each person (includes,
where applicable, a legal entity). If the following two sub-boxes are insufficient, continue in the "Supplemental Box" (giving there for
each additional person the same indications as those requested in the following two sub-boxes) or by using a "continuation sheet."

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only):

☒ applicant and
inventor *

☐ applicant
only

☐ inventor
only *

Name and address: **

HOFVANDER, Per
Doppinggränd 8
S-230 11 FALSTERBO
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant* or *applicant and inventor*, indicate also:

State of nationality: Sweden

State of residence: * Sweden

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

☐ all designated
States

☐ all designated States except
the United States of America

☒ the United States
of America only

☐ the States indicated
in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only):

☒ applicant and
inventor *

☐ applicant
only

☐ inventor
only *

Name and address: **

PERSSON, Per T.
Travgatan 9
S-291 65 KRISTIANSTAD
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant* or *applicant and inventor*, indicate also:

State of nationality: Sweden

State of residence: * Sweden

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

☐ all designated
States

☐ all designated States except
the United States of America

☒ the United States
of America only

☐ the States indicated
in the "Supplemental Box"

* If the person indicated as "applicant and inventor" or as "inventor only" is not an *inventor* for the purposes of all the designated
States, give the necessary indications in the "Supplemental Box"

** Indicate the name of a natural person by giving his/her family name first followed by the given name(s). Indicate the name of a legal
entity by its full official designation. In the address, include both the postal code (if any) and the State (name).

*** If residence is not indicated, it will be assumed that the State of residence is the same as the State indicated in the address.

Box No. III CONTINUATION (REQUIRED) FURTHER APPLICANTS, IF ANY, (FURTHER) INVENTORS, IF ANY; DESIGNATED STATES FOR WHICH THEY ARE APPLICANTS (IF APPLICABLE). A separate sub-box has to be filled in in respect of each person (includes, where applicable, a legal entity).

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only):

☒ applicant and inventor*

☐ applicant only

☐ inventor only*

Name and address:**

TALLBERG, Anneli
Drapavägen 69
S-223 74 LUND
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant* (or *applicant and inventor*), indicate also:

State of nationality:

State of residence:***

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only):

☒ applicant and inventor*

☐ applicant only

☐ inventor only*

Name and address:**

WIKSTRÖM, Olle
Wasagatan 1
S-291 53 KRISTIANSTAD
Sweden

If the person identified in this sub-box is *applicant* (or *applicant and inventor*), indicate also:

State of nationality: Sweden

State of residence:***

Sweden

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only):

☐ applicant and inventor*

☐ applicant only

☐ inventor only*

Name and address:**

If the person identified in this sub-box is *applicant* (or *applicant and inventor*), indicate also:

State of nationality:

State of residence:***

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the "Supplemental Box"

The person identified in this sub-box is (mark one check-box only):

☐ applicant and inventor*

☐ applicant only

☐ inventor only*

Name and address:**

If the person identified in this sub-box is *applicant* (or *applicant and inventor*), indicate also:

State of nationality:

State of residence:***

and whether that person is *applicant* for the purposes of (mark one check-box only):

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the "Supplemental Box"

* If the person indicated as "applicant and inventor" or as "inventor only" is not an *inventor* for the purposes of all the designated States, give the necessary indications in the "Supplemental box."

** Indicate the name of a natural person by giving his/her family name first followed by the given name(s). Indicate the name of a legal entity by its full official designation. In the address, include both the postal code (if any) and the State (name).

*** If residence is not indicated, it will be assumed that the State of residence is the same as the State indicated in the address.

If this continuation sheet is not used, it need not be included in the Request.

Box No. IV AGENT (IF ANY) OR COMMON REPRESENTATIVE (IF ANY); ADDRESS FOR NOTIFICATIONS (IN CERTAIN CASES). A common representative may be appointed only if there are several applicants and if no agent is or has been appointed; the common representative must be one of the applicants.

The following person (includes, where applicable, a legal entity) is hereby has been appointed as agent or common representative to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities:

Name and address, including postal code and country:

If the space below is used instead for an address for notifications, mark here: ☐

AWAPATENT AB
Box 5117
S-200 71 MALMÖ
Sweden

Telephone number (including area code):

+46 40 71620

Telegraphic address:

awapatent malmoe

Teleprinter address:

32407 awapat S

Box No. V DESIGNATION OF GROUPS OF STATES OR STATES⁽¹⁾; CHOICE OF CERTAIN KINDS OF PROTECTION OR TREATMENT. The following designations are hereby made (please mark the applicable check-boxes):

Regional Patent

☒ EP European Patent⁽²⁾: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IT Italy, LU Luxembourg, NL Netherlands, SE Sweden, MC Monaco
and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

☒ OA OAPI Patent: Benin, Burkina Faso, Cameroon, Central African Republic, Chad, Congo, Gabon, Mali, Mauritania, Senegal, Togo,
and any other State which is a Contracting State of OAPI and of the PCT; if other OAPI title desired, specify on dotted line⁽³⁾:

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line⁽³⁾)

<input checked="" type="checkbox"/> AT Austria ⁽³⁾	<input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea ⁽³⁾
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australia ⁽³⁾	<input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka
<input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados	<input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg ⁽³⁾
<input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria ⁽³⁾	<input checked="" type="checkbox"/> MC Monaco ⁽³⁾
<input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil ⁽³⁾	<input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar
<input checked="" type="checkbox"/> CA Canada	<input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi ⁽³⁾
<input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein	<input checked="" type="checkbox"/> NL Netherlands
<input checked="" type="checkbox"/> DE Germany ⁽³⁾	<input checked="" type="checkbox"/> NO Norway
<input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark	<input checked="" type="checkbox"/> PL Poland ⁽³⁾
<input checked="" type="checkbox"/> ES Spain ⁽³⁾	<input checked="" type="checkbox"/> RO Romania
<input checked="" type="checkbox"/> FI Finland	<input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan
<input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom	<input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden
<input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary	<input checked="" type="checkbox"/> SU Soviet Union ⁽³⁾
<input checked="" type="checkbox"/> JP Japan ⁽³⁾	<input checked="" type="checkbox"/> US United States of America ⁽³⁾
<input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea ⁽³⁾	

Space reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after the issuance of this sheet:

(1) The applicant's choice of the order of designations may be indicated by marking the check-boxes with sequential arabic numerals (see also the "Notes to Box No. V").

(2) The selection of particular States for a European patent can be made upon entering the national (regional) phase before the European Patent Office (see also the "Notes to Box No. V").

(3) If another kind of protection or a title of addition or, in the United States of America, treatment as a continuation or a continuation-in-part is desired, specify according to the instructions given in the "Notes to Box No. V."

Box No. VI PRIORITY CLAIM (IF ANY). The priority of the following earlier application is hereby claimed:

Country (country in which it was filed if national application; one of the countries for which it was filed if regional or international application)	Filing Date (day, month, year)	Application No.	Office of filing (fill in only if the earlier application is an international application or a regional application)
(1) Sweden	21 December 1990 21.12.1990	9004096-5	
(2)			
(3)			

(Letter codes may be used to indicate country and/or Office of filing)

When the earlier application was filed with the Office which, for the purposes of the present international application, is the receiving Office, the applicant may, *against payment of the required fee*, ask the following:

☒ the receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the above-mentioned earlier application of the earlier applications identified above by the numbers (insert the applicable numbers) 9004096-5

Box No. VII EARLIER SEARCH (IF ANY). Fill in where a search (international, international-type or other) by the International Searching Authority has already been requested (or completed) and the said Authority is now requested to base the international search, to the extent possible, on the results of the said earlier search. Identify such search or request either by reference to the relevant application (or the translation thereof) or by reference to the search request.

International application number or number and country (or regional Office) of other application:

9004096-5

International/regional/national filing date:

21.12.1990

Date of request for search:

21.12.1990

Number (if available) given to search request:

SE90/00595

Box No. VIII SIGNATURE OF APPLICANT(S) OR AGENT


Ingrid Wiklund

If the present Request form is signed on behalf of any applicant by an agent, a separate power of attorney appointing the agent and signed by the applicant is required. If in such case it is desired to make use of a general power of attorney (deposited with the receiving Office), a copy thereof must be attached to this form.

Box No. IX CHECK LIST (To be filled in by the Applicant)

This international application contains the following number of sheets:

- | | |
|----------------|------------------|
| 1. request | 4 sheets |
| 2. description | 31 sheets |
| 3. claims | 2 sheets |
| 4. abstract | 1 sheets |
| 5. drawings | 6 sheets |
| Total | 44 sheets |

Figure number 2 of the drawings (if any) is suggested to accompany the abstract for publication.

This international application as filed is accompanied by the items marked below:

- ☒ separate signed power of attorney 3 st
- ☐ copy of general power of attorney
- ☐ priority document(s) (see Box No. VI)
- ☐ receipt of the fees paid or revenue stamps
- ☒ cheque for the payment of fees
- ☐ request to charge deposit account
- ☒ other document (specify) fee calculation sheet
- ☒ x copy of official letter

(The following is to be filled in by the receiving Office) 9. ITS-Search Report

- Date of actual receipt of the purported international application:
- Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:
- Date of timely receipt of the required corrections under Article 11 of the PCT:
- Drawings ☐ Received ☐ No Drawings

(The following is to be filled in by the International Bureau)

Date of receipt of the record copy:

196

GENTEKNIKSK FÖRÄNDRING AV POTATIS FÖR BILDNING AV STÄRKELSE
AV AMYLOPEKTINTYP

Föreliggande uppfinning avser genteknisk förändring
5 av potatis, vilken resulterar i bildning av praktiskt ta-
get enbart stärkelse av amylopektintyp i potatisen. Den
gentekniska förändringen innebär införande av genfragment
i potatis, vilka genfragment omfattar delar av ledarsek-
vens, translationsstart, translationsslut och trailer-sek-
10 vens samt kodande och icke-kodande (dvs exoner och intro-
ner) delar av genen för stärkelsekornbundet stärkelsesyn-
tas, insatta i antisens-riktning.

Uppfinningens bakgrund

Stärkelse i olika former har stor betydelse inom
15 livsmedels- och pappersindustrin. I framtiden kommer stär-
kelse också att utgöra en stor potential för tillverkning
av i naturen nedbrytbara polymerer, t ex för användning
som förpackningsmaterial. Många olika stärkelseprodukter
är kända, vilka framställts genom derivatisering av nativ
20 stärkelse med ursprung i bl a majs och potatis. Stärkelse
från potatis respektive från majs konkurrerar inom de
flesta marknadsområden.

I potatisknölen utgör stärkelse den största andelen
av torrsubstansen. Ca 1/4 till 1/5 av stärkelsen i potatis
25 utgöres av amylos, medan resten av stärkelsen är amylopek-
tin. Dessa båda komponenter av stärkelsen har olika an-
vändningsområden och det är därför av stort intresse att
kunna framställa antingen rent amylos eller rent amylopek-
tin. De båda stärkelsekomponenterna kan framställas ur
30 vanlig stärkelse, vilket kräver många processteg och däri-
genom blir dyrbart och omständligt.

Det har nu visat sig att det med genteknologi är möj-
ligt att förändra potatis så att knölarna endast produce-
rar huvudsakligen stärkelse av den ena eller andra typen.
35 Härigenom skapas en stärkelsekvalitet som kan konkurrera
på de områden där potatisstärkelse idag normalt ej an-
vänds. Stärkelse från sådan gentekniskt förändrad potatis

har stor potential som livsmedelstillsats, eftersom den inte genomgått någon kemisk modifieringsprocess.

Stärkelsesyntes

Syntesen av stärkelse och regleringen därav studeras för närvarande med stort intresse, både på grundforskningsnivå och med tanke på industriell tillämpning. Fastän man känner till mycket om vissa enzyms medverkan i omvandlingen av sackaros till stärkelse, är stärkelsens biosyntes ännu inte klarlagd. Genom undersökning av framförallt majs har man dock kunnat klarlägga en del av syntesvägarna och de enzymer som deltar i dessa reaktioner. De viktigaste stärkelsesyntetiserande enzymerna för uppbyggnad av stärkelsekornen är stärkelsesyntas och "branching enzyme". I majs har man hittills påvisat och studerat tre former av stärkelsesyntas, varav två är lösliga och en är olösligt associerad till stärkelsekornen. Även "branching enzyme" består av tre former, vilka troligen kodas av tre olika gener (Mac Donald & Preiss, 1985; Preiss, 1988).

waxy-genen i majs

Syntesen av stärkelsekomponenten amylos sker huvudsakligen genom inverkan av stärkelsesyntaset alfa-1,4-D-glukan-4-alfa-glukosyltransferas (EC 2.4.1.21), som är associerat med stärkelsekornen i växtcellen. Genen som kodar för detta stärkelsekornbundna enzym kallas "waxy" (= wx^+), medan enzymet benämns "GBSS" (granule bound starch synthase).

waxy-locus i majs har grundligt karaktäriserats, såväl genetiskt som biokemiskt. waxy-genen, belägen på kromosom 9, kontrollerar produktionen av amylos i endosperm, pollen och embryosäck. Stärkelsen som bildas i endosperm hos normal majs med wx^+ -allelen består till 25% av amylos och till 75% av amylopektin. En mutant form av majs har påträffats, i vilken endospermet innehåller en mutation lokaliserad till wx^+ -genen, varför inget funktionsdugligt GBSS syntetiseras. Endosperm från denna mutantmajs innehåller därför enbart amylopektin som stärkelsekomponent. Denna sk waxy-mutant innehåller således varken GBSS eller amylos (Echt & Schwartz, 1981).

GBSS-proteinet kodas av wx^+ -genen i cellkärnan men transporteras till och är verksamt i amyloplasten. Preproteinet består därför av två komponenter, nämligen en 7 kD transitpeptid för transport av proteinet över amyloplast-

5 membranet samt det egentliga proteinet, som är 58 kD. Den kodande regionen av wx^+ -genen i majs är 3,7 kb lång och består av 14 exoner och 13 introner. Flera av regulations-

10 signalerna i promotorregionen är kända och två olika polyadenyleringssekvenser har beskrivits (Klösgen et al, 1986; Schwartz-Sommer et al, 1984; Shure et al, 1983).

Amylosenzym i potatis

I potatis har man identifierat ett 60 kD protein, som utgör det huvudsakliga stärkelsekornbundna proteinet. Eftersom antikroppar mot detta potatisenzym korsreagerar med

15 GBSS från majs antar man att det är det stärkelsekornbundna syntaset (Vos-Scheperkeuter et al, 1986). Genen för potatis-GBSS har dock hittills inte karaktäriserats i samma utsträckning som waxy-genen i majs, varken vad gäller lokalisering eller uppbyggnad.

20 Naturligt förekommande waxy-mutanter har beskrivits för korn, ris och sorghum förutom för majs. I potatis har man inte funnit någon naturlig mutant, men däremot har man framställt en mutant genom röntgenbestrålning av blad från en monohaploid ($n=12$) planta (Visser et al, 1987). Stär-

25 kelse isolerad från knölar av denna mutant innehåller varken GBSS-proteinet eller amylos. Mutanten betingas av en enkel recessiv gen och benämns amf. Den kan liknas vid waxy-mutanter av andra växtslag eftersom såväl GBSS-proteinet som amylos saknas. Stabiliteten av kromosomtalet

30 försvagas dock då detta fyrdubblas till det naturliga talet ($n=48$), vilket kan förorsaka negativa effekter på potatisplantorna (Jacobsen et al, 1990).

Inhibering av amylosproduktion

Syntesen av amylos kan drastiskt reduceras genom in-

35 hibering av det stärkelsekornbundna stärkelsesyntaset, GBSS, vilket katalyserar bildningen av amylos. Denna inhibering resulterar i att stärkelsen huvudsakligen kommer att bestå av amylopektin.

Inhibering av bildningen av enzym kan åstadkommas på flera sätt, t ex genom:

- mutagenbehandling, vilket medför en förändring av gensekvensen som kodar för bildningen av enzymet
- 5 - införlivande av en transposon i gensekvensen som kodar för enzymet
- genteknisk modifiering så att genen som kodar för enzymet inte uttrycks, t ex antisens-geninhibering.

I fig 1 visas ett specifikt undertryckande av normal
10 genexpression genom att en komplementär antisens-nukleotid får hybridisera med mRNA för en målgen. Antisens-nukleotiden är således antisens-RNA, som transkriberas in vivo från en "omvänd" gensekvens (Izant, 1989).

Genom användning av antisens-teknik har olika gen-
15 funktioner i växter inhiberats. Antisens-konstruktionen för chalkonsyntas, polygalakturonas och fosfinotricin-acyltransferas har använts för att inhibera motsvarande enzym i växtslagen petunia, tomat respektive tobak.

Inhibering av amylos i potatis

20 I potatis har man tidigare försökt inhibera syntesen av det stärkelsekornbundna stärkelsesyntaset (GBSS-proteinet) med en antisens-konstruktion motsvarande genen som kodar för GBSS (i fortsättningen benämns denna gen "GBSS-genen"). Hergersberger (1988) beskriver en metod, genom
25 vilken en cDNA-klon för GBSS-genen i potatis har isolerats med hjälp av en cDNA-klon för wx⁺-genen i majs. En antisens-konstruktion baserad på hela cDNA-klonen överfördes till bladdiskar av potatis med hjälp av Agrobacterium tumefaciens. I mikroknölar inducerade in vitro från rege-
30 nerade potatisskott observerades en varierande och mycket svag reduktion av amyloshalten, visad i diagram. Någon fullständig karaktärisering av GBSS-genen ges inte.

Genen för GBSS-proteinet i potatis har ytterligare karaktäriserats genom att en genomisk wx⁺-klon undersökts
35 med restriktionsanalys. Dock har klonens DNA-sekvens inte bestämts (Visser et al, 1989).

Ytterligare försök med en antisens-konstruktion motsvarande GBSS-genen i potatis har rapporterats. Antisens-konstruktionen, som bygger på en cDNA-klon tillsammans med CaMV 35S-promotorn, har transformerats med hjälp av Agrobacterium rhizogenes. Transformationen resulterade enligt uppgift i lägre amylosinnehåll i potatisen, men inga värden redovisas (Flavell, 1990).

Ingen av de hittills använda metoderna för genteknisk förändring av potatis har resulterat i potatis med praktiskt taget ingen stärkelse av amylostyp.

Ändamålet med uppfinningen är därför att åstadkomma ett så gott som fullständigt undertryckande av bildningen av amylos i potatisknölar.

Sammanfattning av uppfinningen

Enligt uppfinningen inhiberas funktionen av GBSS-genen och därmed amylosproduktionen i potatis genom användning av helt nya antisens-konstruktioner. För bildning av antisens-fragmenten enligt uppfinningen utgår man från den genomiska GBSS-genen för att uppnå en så effektiv inhibering av GBSS och därigenom av amylosproduktionen som möjligt. Antisens-konstruktionerna enligt uppfinningen omfattar såväl kodande som icke-kodande delar av GBSS-genen som motsvarar sekvenser i regionen omfattande promotor samt ledarsekvens, translationsstart, translationsslut samt trailer-sekvens i antisens-riktning. För att få ett vävnadsspecifikt uttryck, dvs amylosproduktionen skall inhiberas enbart i potatisknölarna, används promotorer som är specifikt verksamma i potatisknölen. Härigenom påverkas inte stärkelsesammansättningen i andra delar av växten, vilket annars skulle kunna ge negativa bieffekter.

Uppfinningen omfattar således ett fragment som har i huvudsak någon av de nukleotidsekvenser som anges i SEQ ID nr 1, SEQ ID nr 2 eller SEQ ID nr 3. Sekvenserna kan dock avvika från de angivna med något eller några ej intill varandra liggande baspar utan att fragmentens funktion påverkas.

Uppfinningen omfattar även en potatisknölspecifik promotor omfattande 987 bp, vilken promotor hör till genen enligt uppfinningen som kodar för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas. Varken promotorn eller tillhörande gen har tidigare karaktäriserats. Promotorns sekvens av 987 bp är angiven i SEQ ID nr 4 medan genens sekvens är angiven i SEQ ID nr 5. Även promotorns och genens sekvenser kan avvika från de angivna med något eller några ej intill varandra liggande baspar, utan att deras funktion påverkas.

Uppfinningen omfattar likaså vektorer vilka inbegriper antisens-fragmenten respektive antisens-konstruktionerna enligt uppfinningen.

I andra aspekter omfattar uppfinningen celler, planor, knölar, mikroknölar respektive frön, vilkas genom innehåller fragmenten enligt uppfinningen insatta i antisens-riktning.

I ytterligare andra aspekter omfattar uppfinningen stärkelse av amylopektintyp, både nativ och derivatiserad. Slutligen omfattar uppfinningen ett förfarande för undertryckande av amylosbildning i potatis, varigenom huvudsakligen stärkelse av amylopektintyp bildas i potatisen.

Uppfinningen beskrivs närmare med hjälp av bifogade figurer, vari

- fig 1 visar principen för antisens-geninhibering;
- fig 2 visar resultatet av restriktionsanalys av potatis-GBSS-genen;
- fig 3 visar två nya binära vektorer pHo3 och pHo4;
- fig 4 visar antisens-konstruktionerna pHoxwA, pHoxwB och pHoxwD;
- fig 5 visar antisens-konstruktionerna pHoxwF och pHoxwG;
- fig 6 visar antisens-konstruktionerna pHoxwK och pHoxwL.

Dessutom visas sekvenserna för de olika DNA-fragmenten enligt uppfinningen i SEQ ID nr 1, 2, 3, 4 och 5. Avvikelser från dessa sekvenser kan förekomma i något eller några ej intill varandra liggande baspar.

5 MATERIAL

Vid det praktiska genomförandet av uppfinningen har följande material använts:

- Bakteriestammar^{strain}: E. coli DH5alfa och DH5alfaF'IQ(BRL). E. coli JM105 (Pharmacia). A. tumefaciens LBA4404 (Clontech).
- 10 Vektorer: M13mp18 och mp19 (Pharmacia). pBI101 och pBI121 (Clontech). pBI240.7 (M. W. Bevan). pUC plasmider (Pharmacia).
- Enzymer: Restriktionsenzymer och EcoRI linker (BRL). UNIONTM DNA Ligation Kit (Clontech). SequenaseTM DNA
- 15 Sequencing Kit (USB). T₄-DNA ligas (Pharmacia).

Ovan angivna material används i enlighet med av tillverkarna angivna specifikationer.

Genomiskt bibliotek

- Ett genomiskt bibliotek i EMBL3 har producerats av
- 20 Clontech för sökandens räkning med blad av potatissorten Bintje som utgångsmaterial.

Identifiering och isolering av GBSS-genen

- Det genomiska biblioteket har screenats för potatis-GBSS-genen med hjälp av cDNA-kloner för såväl 5'- som
- 25 3'-ändan av genen (vilka cDNA-kloner erhöles från M Hergersberger, Max Plankinstitutet i Köln) i enlighet med protokoll från Clontech.

- En fullängdsklon av potatis-GBSS-genen wx311 har identifierats och isolerats ur det genomiska biblioteket.
- 30 Början av GBSS-genen har bestämts till ett EcoRI-fragment och kallas fragment w (3,95 kb). Slutet av GBSS-genen har också bestämts till ett EcoRI-fragment, vilket kallas fragment x (5,0 kb). Ett BgIII-SpeI fragment, vilket kallas fragment m (3,9 kb), har också isolerats; detta fragment
- 35 delar sekvenser från såväl fragment w som fragment x. Fragmenten w, m och x har subklonats i pUC13 (Viera, 1982; Yanisch-Peron et al, 1985) och betecknas pSw, pSm respektive pSx (fig 2).

Karaktärisering av GBSS-genen i potatis

GBSS-genen i potatis har karaktäriserats med hjälp av restriktionsanalys och cDNA-prober, varvid 5'- och 3'-ändan av GBSS-genen bestämts noggrannare (fig 2). Sekvensbestämning enligt Sanger et al, 1977, av GBSS-genen har gjorts på subkloner från pSw och pSx i M13mpl8 och mpl9 samt pUC19 med start kring 5'-ändan (se SEQ ID nr 5).

Promotorregionen är bestämd till ett BglII-NsiI-fragment (se SEQ ID nr 4). Transkriptions- och translationsstart har bestämts till ett överlappande BglII-HindIII-fragment. Terminatorregionen i sin tur är bestämd till ett SpeI-HindIII-fragment.

Antisens-konstruktioner för GBSS-genen i potatis

GBSS-genfragmenten enligt uppfinningen (se SEQ ID nr 1, 2 och 3 och fig 2) har bestämts på följande sätt.

Restriktion av pSw med NsiI och HindIII ger fragment I (SEQ ID nr 1), som subklonat i pUC19 kallas 19NH35. Vidare restriktion av 19NH35 med HpaI-SstI ger ett fragment innehållande 342 bp av GBSS-genen enligt uppfinningen.

Detta fragment består av ledarsekvens, translationsstart samt de första 125 bp av den kodande regionen.

Restriktion av pSm med HpaI och NsiI ger fragment II (SEQ ID nr 2), som subklonat i pJRD184 (Heusterspreute et al, 1987) kallas pJRDmitt. Vidare restriktion av pJRDmitt med HpaI-SstI ger ett fragment som innehåller 2549 bp av GBSS-genen enligt uppfinningen. Detta fragment består av exoner och introner ur mittdelen av genen.

Restriktion av pSx med SstI och SpeI ger fragment III (SEQ ID nr 3) som subklonat i pBluescript (Melton et al, 1984) kallas pBlue3'. Vidare restriktion av pBlue3' med BamHI-SstI ger ett fragment som innehåller 492 bp av GBSS-genen enligt uppfinningen. Detta fragment består av sista intron och exon, translationsslut samt 278 bp av trailer-sekvens.

Antisens-konstruktioner med fragment I (fig 4): För antisens-konstruktionen pHoxwA har HpaI-SstI fragmentet från 19NH35 insatts i antisens-riktning i den binära vektor

pBI121 (Jefferson et al, 1987) klyvd med SmaI-SstI. Transkriptionen av antisens-fragmentet initieras då av CaMV 35S-promotorn och termineras av NOS-terminatorn (NOS = nopalinsyntas).

- 5 För antisens-konstruktionen pHoxwB har HpaI-SstI fragmentet från 19NH35 insatts i antisens-riktning i den binära vektorn pHo4 (fig 3) klyvd med SmaI-SstI. Patatin I promotorn, som är knölspecifik i potatis, kommer från vektorn pBI240.7, erhållen från M. Bevan, Institute of Plant
10 Science Research i Norwich. Transkriptionen av antisens-fragmentet initieras då av patatin I-promotorn och termineras av NOS-terminatorn.

- För antisens-konstruktionen pHoxwD har HpaI-SstI fragmentet från 19NH35 insatts i antisens-riktning i den
15 binära vektorn pHo3 (fig 3) klyvd med SmaI-SstI. pHo3 är en ny binär vektor som konstruerats utgående från pBI101. Denna vektor, som innehåller promotorn enligt uppfinningen (se SEQ ID nr 4) (GBSS-promotorn) till den nu karakteriserade potatis-GBSS-genen enligt uppfinningen, har restriktionsklyvts med SmaI och SstI, varvid HpaI-SstI-fragmentet
20 från 19NH35 insatts i antisens-riktning. Transkriptionen av antisens-fragmentet initieras då av den egna GBSS-promotorn och termineras av NOS-terminatorn. Detta innebär att antisens-fragmentet transkriberas enbart i potatisknölen, eftersom GBSS-promotorn i likhet med patatin I-promotorn är knölspecifik.
25

- Antisens-konstruktioner med fragment II (fig 5): För antisens-konstruktionen pHoxwF har HpaI-SstI fragmentet från pJRDmitt insatts i antisens-riktning i den binära vektorn
30 pHo4 klyvd med SmaI-SstI. Transkriptionen av antisens-fragmentet initieras då av patatin I-promotorn och termineras av NOS-terminatorn.

- För antisens-konstruktionen pHoxwG har HpaI-SstI fragmentet från pJRDmitt insatts i antisens-riktning i den
35 binära vektorn pHo3 klyvd med SmaI-SstI. Transkriptionen av antisens-fragmentet initieras då av den egna GBSS-promotorn och termineras av NOS-terminatorn.

Antisens-konstruktioner med fragment III (fig 6): För antisens-konstruktionen pHoxwK har BamHI-SstI fragmentet från pBlue3' insatts i antisens-riktning i den binära vektorn pHo4 klyvd med BamHI-SstI. Transkriptionen av antisens-fragmentet initieras då av patatin I-promotorn och termineras av NOS-terminatorn.

För antisens-konstruktionen pHoxwL har BamHI-SstI fragmentet från pBlue3' insatts i antisens-riktning i den binära vektorn pHo3 klyvd med BamHI-SstI. Transkriptionen av antisens-fragmentet initieras då av den egna GBSS-promotorn och termineras av NOS-terminatorn.

De bildade antisens-konstruktionerna (fig 4, 5, 6) har transformerats till *Agrobacterium tumefaciens* stam LBA4404 genom direkt transformation med "frys-upptinings"-metoden (Hoekema et al, 1983; An et al, 1988).

Transformation

Antisens-konstruktionerna överförs till bakterier, lämpligen medelst "frys-upptiningsmetoden" (An et al, 1988). Överföringen av den rekombinanta bakterien till potatisvävnad sker genom inkubation av potatisvävnaden med den rekombinanta bakterien i lämpligt medium efter det att någon form av skada tillförts potatisvävnaden. Under inkuberingen går T-DNA från bakterien in i värdväxtens DNA. Efter inkuberingen dödas bakterierna och potatisvävnaden överförs på fast medium för kallusinduktion och inkuberas för kallustillväxt.

Efter lämpliga passager genom ytterligare medier bildas skott, vilka skärs bort från potatisvävnaden.

Kontroller för test av antisens-konstruktionernas expression samt överföring till potatisgenomet utförs med exempelvis southern och northern hybridisering (Maniatis et al (1982)). Antalet kopior av antisens-konstruktionen som överförts bestäms med southern hybridisering.

Kontrollen av expressionen på proteinnivå utförs lämpligen på mikrokölar inducerade in vitro på de transformerade skotten för att man så snabbt som möjligt skall kunna genomföra kontrollen.

Karaktärisering av GBSS-proteinet

Antisens-konstruktionernas inverkan på GBSS-genens funktion med avseende på GBSS-proteinets aktivitet undersöks genom att stärkelse utvinnes ur mikroknölarna och
 5 analyseras med avseende på närvaron av GBSS-proteinet. Vid elektrofores på polyakrylamidgel (Hovenkamp-Hermelink et al, 1987) bildar GBSS-proteinet ett distinkt band vid 60 kD då GBSS-genen är i funktion. Då GBSS-genen inte uttrycks, dvs då antisens-GBSS-genen uttrycks i full ut-
 10 sträckning så att bildningen av GBSS-protein inhiberas, påvisas inget 60 kD-band på gelen.

Karaktärisering av stärkelsen

Stärkelsesammansättningen i mikroknölar är identisk med den i vanliga potatisknölar och därför kan antisens-
 15 -konstruktionernas inverkan på amylosproduktionen undersökas i mikroknölar. Förhållandet mellan amylos och amylopektin kan bestämmas med en spektrofotometrisk metod (t ex enligt Hovenkamp-Hermelink et al, 1988).

Utvinning av amylopektin ur amylopektinpotatis

20 Amylopektinet utvinns ur den s k amylopektinpotatisen (potatis vari bildningen av amylos har undertryckts genom införandet av antisens-konstruktionerna enligt uppfinningen) på känt sätt.

Derivatisering av amylopektin

25 Beroende på amylopektinets slutliga användning kan dess fysikaliska och kemiska egenskaper förändras genom derivatisering. Med derivatisering avses här såväl kemisk som fysikalisk och enzymatisk behandling samt kombinationer av dessa (Modified starches).

30 Den kemiska derivatiseringen, dvs kemisk förändring av amylopektinet, kan ske på olika sätt, exempelvis genom oxidation, syrahydrolys, dextrinisering, olika former av företring, t ex katjonisering, hydroxipropylering och hydroxietylering, olika former av företring, t ex med vinyl-
 35 acetat, ättiksyraanhydrid, eller genom monofosfatering, difosfatering och oktenylsuccinering, samt kombinationer av dessa.

Fysikalisk förändring av amylopektinet, kan exempelvis åstadkommas genom valstorkning eller extrudering.

Vid enzymatisk derivatisering utförs en nedbrytning (minskning av viskositeten) och kemisk modifiering av amylopektinet med hjälp av förekommande enzymatiska system.

Derivatiseringen genomförs vid olika temperaturer, allt efter vilken slutprodukt man önskar framställa. Det vanliga temperaturområdet som man arbetar inom är 20-45°C, men temperaturer upp till 180°C kan användas.

Uppfinningen beskrivs närmare i följande exempel.

Exempel 1

Framställning av mikroknölar med insatta antisens-konstruktioner enligt uppfinningen

Antisens-konstruktionerna (se fig 4, 5 och 6) överförs till *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 med hjälp av "frys-upptinningsmetoden" (An et al, 1988). Överföringen till potatisvävnad utförs enligt ett modifierat protokoll enligt Rocha-Sosa et al (1989).

Bladdiskar från potatisplantor odlade in vitro inkuberas i mörker på flytande MS-medium (Murashige & Skoog; 1962) med 3% sackaros och 0,5% MES tillsammans med 100 µl av en suspension av rekombinant *Agrobacterium* per 10 ml medium i två dygn. Efter dessa två dygn dödas bakterierna. Bladdiskarna överförs på fast medium för kallusinduktion och inkuberas i 4-6 veckor beroende på kallustillväxt. Det fasta mediet har följande sammansättning:

MS + 3% sackaros

2 mg/l zeatinribosid

0,02 mg/l "NAA"

0,02 mg/l "GA₃"

500 mg/l "Claforan"

50 mg/l kanamycin

0,25% "Gellan"

Härefter överförs bladdiskarna till ett medium med annan hormonsammansättning, omfattande:

MS + 3% sackaros

5 mg/l "NAA"

0,1 mg/l "BAP"

500 mg/l "Claforan"

5 50 mg/l kanamycin

0,25% "Gellan"

Bladdiskarna förvaras på detta medium i ca 4 veckor, varefter de överförs till ett medium där "Claforan"-koncentrationen reducerats till 250 mg/l. Om det behövs flyttas bladdiskarna därefter över till färskt medium var 4:e till 5:e vecka. Efter skottbildning skärs skotten bort från bladdiskarna och överförs till ett identiskt medium.

Att antisens-konstruktionen har överförs till bladdiskarna kontrolleras först genom att bladextrakt från de regenererade skotten analyseras med avseende på glukuronidasaktivitet med de substrat som beskrivits av Jefferson et al (1987). Aktiviteten påvisas genom visuell bedömning.

Ytterligare kontroller av antisens-konstruktionernas expression samt överföring därav till potatisgenomet utförs med southern och northern hybridisering enligt Maniatis et al (1981). Antalet kopior av antisens-konstruktionerna som överförts bestäms med southern hybridisering.

När det konstaterats att antisens-konstruktionerna överförts till och uttryckts i potatisgenomet vidtar kontrollen av expressionen på proteinnivå. För att inte behöva vänta på utvecklingen av en fullständig potatisplanta med potatisknölar utförs kontrollen på mikroknölar som inducerats in vitro på de transformerade skotten.

Stambitar av potatis-skotten klipps av vid noderna och placeras på modifierat MS-medium. Där bildar de mikroknölar efter 2-3 veckor vid inkubering i mörker vid 19°C (Bourque et al, 1987). Mediet har följande sammansättning:

MS + 6% sackaros

2,5 mg/l kinetin

35 2,5 mg/l "Gellan"

Antisens-konstruktionernas inverkan på GBSS-genens funktion med avseende på GBSS-proteinets aktivitet analyseras med hjälp av elektrofores på polyakrylamidgel (Hovenkamp-Hermelink et al, 1987). Stärkelse utvinns ur mikrokörlarna och analyseras med avseende på närvaron av GBSS-proteinet. I en polyakrylamidgel bildar GBSS-proteinet ett distinkt band vid 60 kD då GBSS-genen är i funktion. Om GBSS-genen inte uttrycks, dvs då antisens-GBSS-genen uttrycks till fullo så att bildningen av GBSS-protein inhiberas, kan man inte se något 60 kD-band på gelen.

Stärkelsesammansättningen, dvs förhållandet mellan amylos och amylopektin, bestäms med en spektrofotometrisk metod enligt Hovenkamp-Hermelink et al (1988), varvid halten av respektive stärkelsekomponent bestäms utifrån en standardkurva.

Exempel 2

Utvinning av amylopektin ur amylopektinpotatis

Potatis, vars huvudsakliga stärkelsekomponent utgörs av amylopektin, här kallad amylopektinpotatis, gentekniskt förändrad enligt uppfinningen, rivs så att stärkelsen frigörs från cellväggarna.

Cellväggarna (fibrerna) avskiljs från fruktsaft och stärkelse i centrisiler. Fruktsaften avskiljs från stärkelsen i två steg, nämligen först i hydrocykloner och därefter i speciellt konstruerade vakuumbandfilter.

Därefter utförs en slutraffinering i hydrocykloner, där resten av fruktsaften och fibrerna avskiljs.

Produkten torkas i två steg, först genom en förtorkning på vakuumfilter och därefter en sluttorkning i varm-luftström.

Exempel 3

Kemisk derivatisering av amylopektin

Amylopektin uppslammas i vatten till en koncentration av 20-50%. pH-värdet justeras till 10,0-12,0 och en kvar-^{quaternary}tär ammoniumförening tillsätts i en sådan mängd att slutprodukten får en substitutionsgrad av 0,004-0,2. Reaktionstemperaturen inställs till 20-45°C. Då reaktionen är

klar justeras pH-värdet till 4-8, varefter produkten tvättas och torkas. På detta sätt erhålles det katjoniska stärkelsederivatet 2-hydroxi-3-trimetylammoniumpropyleter.

Exempel 4

5 Kemisk derivatisering av amylopektin

Amylopektin uppslammas i vatten till en vattenhalt av 10-25 vikt%. pH-värdet justeras till 10,0-12,0 och en kvartär ammoniumförening tillsätts i en sådan mängd att slutprodukten får en substitutionsgrad av 0,004-0,2. Reaktionstemperaturen inställs på 20-45°C. Då reaktionen är klar justeras pH-värdet till 4-8. Slutprodukten är 2-hydroxi-3-trimetylammoniumpropyleter.

Exempel 5

Kemisk derivatisering av amylopektin

15 Amylopektin uppslammas i vatten till en koncentration av 20-50 vikt%. pH-värdet justeras till 5,0-12,0 och natriumhypoklorit tillsätts så att slutprodukten får önskad viskositet. Reaktionstemperaturen inställs på 20-45°C. Då reaktionen är klar justeras pH-värdet till 4-8, varefter slutprodukten tvättas och torkas. På detta sätt erhålles oxiderad stärkelse.

Exempel 6

Fysikalisk derivatisering av amylopektin

25 Amylopektin uppslammas i vatten till en koncentration av 20-50 vikt%, varefter uppslamningen anbringas på en uppvärmd vals, där den torkas till en film.

Exempel 7

Kemisk och fysikalisk derivatisering av amylopektin

30 Amylopektin behandlas enligt de förfaranden som beskrivs i något av exemplen 3-5 för kemisk modifiering och behandlas därefter vidare enligt exempel 6 för fysikalisk derivatisering.

Litteraturreferenser:

- Mac Donald, F. D. och Preiss, J., 1985, Plant. Physiol. 78:849-852
- Preiss, J., 1988, In The Biochemistry of Plants 14
- 5 (Carbohydrates). Ed. J. Preiss, Academic Press; 181-254
- Echt, C. S. och Schwarz, D., 1981, Genetics 99:275-284
- Klösgen, R. B., Gierl, A., Schwarz-Sommer, Z. och Saedler, H., 1986, Mol. Gen. Genet. 203:237-244
- Schwarz-Sommer, Z., Gierl, A., Klösgen, R. B., Wienand, 10 U., Peterson, P. A. och Saedler, H., 1984, EMBO J. 3(5):1021-1028
- Shure, M., Wessler, S. och Fedoroff, N., 1983, Cell 35:225-233
- Jacobsen, E., Kriggsheld, H. T., Hovenkamp-Hermelink, J.
- 15 H. M., Ponstein, A. S., Witholt, B. och Feenstra, W. J., 1990, Plant. Sci. 67:177-182
- Visser, R. G. F., Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Ponstein, A. S., Vos-Scheperkeuter, G. H., Jacobsen, E., Feenstra, W. J. och Witholt, B., 1987, Proc. 4th European
- 20 Congress on Biotechnology 1987, vol 2, Elsevier, Amsterdam; 432-435
- Vos-Scheperkeuter, G. H., De Boer, W., Visser, R. G. F., Feenstra, W. J. och Witholt, B., 1986, Plant. Physiol. 82:411-416
- 25 - Cornelissen, M., 1989, Nucleic Acids Res. 17(18):7203-7209
- Izant, J. G., 1989, Cell Motility and Cytoskeleton 14:81-91
- Sheehy; R. E., Kramer, M., Hiatt, W. R., 1988, Proc.
- 30 Natl. Acad. Sci. USA, 85(23):8805-8809
- Van der Krol, A. R., Mur, L. A., de Lange, P., Gerats, A. G. M., Mol, J. N. M. och Stuitje, A. R., 1960, Mol. Gen. Genet. 220:204-212
- Flavell, R. B., 1990, AgBiotech. News and Information
- 35 2(5):629-630
- Hergersberger, M., 1988, Molekulare Analyse des waxy Gens aus Solanum tuberosum und Expression von waxy

- antisense RNA in transgenen Kartoffeln. Doktorsavhandling från Universitetet i Köln.
- Visser, R. G. F., Hergersberger, M., van der Leij, F. R., Jacobsen, E., Witholt, B. och Feenstra, W. J., 1989, 5 Plant. Sci. 64:185-192
 - An, G., Ebert, P. R., Mitra, A. och Ha, S. B., 1987, Plant Mol. Biol. Manual A3:1-19
 - Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. och Schilperoort, R. A., 1983, Nature 303:179-180
 - 10 - Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. och Bevan, M. W., 1987, EMBO J. 6:3201-3207
 - Sanger, F., Nicklen, S. och Coulson, A. R., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467
 - Viera, J. och Messing, J., 1982, Gene 19:259-268
 - 15 - Yanisch-Perron, C., Viera, J. och Messing, J., 1985, Gene 33:103-119
 - Heusterspreute et al (1987) Gene 53:294-300
 - Melton, D. A. et al (1984), Nucleic Acids Res. 12:7035-7056 (plasmiden säljs av Stratagene)
 - 20 - Murashige, T. och Skoog, F., 1962, Physiol. Plant 15:473-497.
 - Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Shell, J. och Willmitzer, L., 1989, EMBO J., 8(1):23-29
 - 25 - Jefferson, R. A., Kavanagh, R. A. och Bevan, M. W., 1987, EMBO J. 6:3901-3907
 - Maniatis, T., Fritsch, E. F. och Sambrook, J., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
 - 30 - Bourque, J. E., Miller, J. C. och Park, W. D., 1987, In Vitro Cellular & Development Biology 23(5):381-386
 - Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Jacobsen, E., Ponstein, A. S., Visser, R. G. F., Vos-Scheperkeuter, G. H., Bijmolt, E. W., de Vries, J. N., Witholt, B. J. &
 - 35 Feenstra, W. J., 1987, Theor. Appl. Genet. 75:217-221
 - Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., de Vries, J. N., Adamse, P., Jacobsen, E., Witholt, B. och Feenstra, W. J., 1988,

Potato Research 31:241-246

- Modified starches: Properties and use D. B. Wurzburg
- Bevan, M. W., 1984. Nucleic Acids Res. 12:8711-8721.

5

10

15

20

25

30

35

19

SEQ ID nr 1

Sekvenserad molekyl: genomiskt DNA

Namn: GBSS-genfragment från potatis

Sekvenslängd: 342 bp

TGCATGTTTC	CCTACATTCT	ATTTAGAATC	GTGTTGTGGT	GTATAAACGT	50
TGTTTCATAT	CTCATCTCAT	CTATTCTGAT	TTTGATTCTC	TTGCCTACTG	100
TAATCGGTGA	TAAATGTGAA	TGCTTCCTTT	CTTCTCAGAA	ATCAATTTCT	150
GTTTTGTTTT	TGTTTCATCTG	TAGCTTATTC	TCTGGTAGAT	TCCCCTTTTT	200
GTAGACCACA	CATCAC	ATG GCA AGC ATC ACA GCT TCA CAC CAC			243
		Met Ala Ser Ile Thr Ala Ser His His			
	1		5		
TTT GTG TCA AGA AGC CAA ACT TCA CTA GAC ACC AAA TCA ACC					285
Phe Val Ser Arg Ser Gln Thr Ser Leu Asp Thr Lys Ser Thr					
10	15		20		
TTG TCA CAG ATA GGA CTC AGG AAC CAT ACT CTG ACT CAC AAT					327
Leu Ser Gln Ile Gly Leu Arg Asn His Thr Leu Thr His Asn					
25	30		35		
GGT TTA AGG GCT GTT					342
Gly Leu Arg Ala Val					
	40				

20

25

30

35

20

SEQ ID nr 2

Sekvenserad molekyll: genomiskt DNA

Namn: GBSS-genfragment från potatis

Sekvenslängd: 2549 bp

AAC AAG CTT GAT GGG CTC CAA TCA ACA ACT AAT ACT AAG GTA	42
Asn Lys Leu Asp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Asn Thr Lys Val	
45 50 55	
ACA CCC AAG ATG GCA TCC AGA ACT GAG ACC AAG AGA CCT GGA	84
Thr Pro Lys Met Ala Ser Arg Thr Glu Thr Lys Arg Pro Gly	
60 65 70	
TGC TCA GCT ACC ATT GTT TGT GGA AAG GGA ATG AAC TTG ATC	126
Cys Ser Ala Thr Ile Val Cys Gly Lys Gly Met Asn Leu Ile	
75 80	
TTT GTG GGT ACT GAG GTT GGT CCT TGG AGC AAA ACT GGT GGA	168
Phe Val Gly Thr Glu Val Gly Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly	
85 90 95	
CTA GGT GAT GTT CTT GGT GGA CTA CCA CCA GCC CTT GCA	207
Leu Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Leu Ala	
100 105 110	
GTAAGTCCTTT CTTTCATTTG GTTACCTACT CATTTCATTAC TTATTTTGTT	257
TAGTTAGTTT CTA CTGTCATC AGTCTTTTTC TCATTTAG GCC CGC GGA	304
Ala Arg Gly	
CAT CGG GTA ATG ACA ATA TCC CCC CGT TAT GAC CAA TAC AAA	346
His Arg Val Met Thr Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys	
115 120 125	
GAT GCT TGG GAT ACT GGC GTT GCG GTT GAG GTACATCTTC	386
Asp Ala Trp Asp Thr Gly Val Ala Val Glu	
130 135	
CTATATTGAT ACGGTACAAT ATTGTTCTCT TACATTTTCCT GATTCAAGAA	436
TGTGATCATC TGCAG GTC AAA GTT GGA GAC AGC ATT GAA ATT GTT	481
Val Lys Val Gly Asp Ser Ile Glu Ile Val	
140 145	
CGT TTC TTT CAC TGC TAT AAA CGT GGG GTT GAT CGT GTT TTT	523
Arg Phe Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val Asp Arg Val Phe	
150 155 160	
GTT GAC CAC CCA ATG TTC TTG GAG AAA GTAAGCATAT	560
Val Asp His Pro Met Phe Leu Glu Lys	
165 170	

214

TATGATTATG AATCCGTCCT GAGGGATACG CAGAACAGGT CATTTTGAGT	610.
ATCTTTTAAC TCTACTGGTG CTTTACTCT TTTAAG GTT TGG GGC AAA	658
Val Trp Gly Lys	175
ACT GGT TCA AAA ATC TAT GGC CCC AAA GCT GGA CTA GAT TAT	700
Thr Gly Ser Lys Ile Tyr Gly Pro Lys Ala Gly Leu Asp Tyr	
180 185	
CTG GAC AAT GAA CTT AGG TTC AGC TTG TTG TGT CAA	736
Leu Asp Asn Glu Leu Arg Phe Ser Leu Leu Cys Gln	
190 195 200	
GTAAGTTAGT TACTCTTGAT TTTTATGTGG CATTTTACTC TTTTGTCTTT	786
AATCGTTTTT TTAACCTTGT TTTCTCAG GCA GCC CTA GAG GCA CCT	832
Ala Ala Leu Glu Ala Pro	205
AAA GTT TTG AAT TTG AAC AGT AGC AAC TAC TTC TCA GGA CCA	874
Lys Val Leu Asn Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Phe Ser Gly Pro	
210 215 220	
TAT G GTAATTAACA CATCCTAGTT TCAGAAACT CCTTACTATA	918
Tyr G	
TCATTGTAGG TAATCATCTT TATTTTGCCT ATTCCTGCAG GA GAG GAT	966
ly Glu Asp	225
GTT CTC TTC ATT GCC AAT GAT TGG CAC ACA GCT CTC ATT CCT	1008
Val Leu Phe Ile Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Ile Pro	
230 235	
TGC TAC TTG AAG TCA ATG TAC CAG TCC AGA GGA ATC TAC TTG	1050
Cys Tyr Leu Lys Ser Met Tyr Gln Ser Arg Gly Ile Tyr Leu	
240 245 250	
AAT GCC AAG GTAAAATTTT TTTGTATTCA CTCGATTGCA	1089
Asn Ala Lys	255
CGTTACCCTG CAAATCAGTA AGGTTGTATT AATATATGAT AAATTTTCACA	1139
TTGCCTCCAG GTT GCT TTC TGC ATC CAT AAC ATT GCC TAC CAA	1182
Val Ala Phe Cys Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln	
260 265	
GGT CGA TTT TCT TTC TCT GAC TTC CCT CTT CTC AAT CTT CCT	1224
Gly Arg Phe Ser Phe Ser Asp Phe Pro Leu Leu Asn Leu Pro	
270 275 280	
GAT GAA TTC AGG GGT TCT TTT GAT TTC ATT GAT GGG TAT	1263
Asp Glu Phe Arg Gly Ser Phe Asp Phe Ile Asp Gly Tyr	
285 290	
GTATTTATGC TTGAAATCAG ACCTCCAAC TTTGAAGCTC TTTTGATGCT	1313

218

CAG GAG ATT GAA CAG CTC GAA GTG TTG TAC CCT AAC AAA GCT	2010
Gln Glu Ile Glu Gln Leu Glu Val Leu Tyr Pro Asn Lys Ala	
445 450	
AAA GGA GTG GCA AAA TTC AAT GTC CCT TTG GCT CAC ATG ATC	2052
Lys Gly Val Ala Lys Phe Asn Val Pro Leu Ala His Met Ile	
455 460 465	
ACT GCT GGT GCT GAT TTT ATG TTG GTT CCA AGC AGA TTT GAA	2094
Thr Ala Gly Ala Asp Phe Met Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu	
470 475 480	
CCT TGT GGT CTC ATT CAG TTA CAT GCT ATG CGA TAT GGA ACA	2136
Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu His Ala Met Arg Tyr Gly Thr	
485 490 495	
GTAAGAACCA GAAGAGCTTG TACCTTTTTTA CTGAGTTTTTT AAAAAAAGAA	2186
TCATAAGACC TTGTTTTCCA TCTAAAGTTT AATAACCAAC TAAATGTTAC	2236
TGCAGCAAGC TTTTCATTTT TGAAAATTGG TTATCTGATT TTAACGTAAT	2286
CACATGTGAG TCAG GTA CCA ATC TGT GCA TCG ACT GGT GGA CTT	2330
Val Pro Ile Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu	
500 505	
GTT GAC ACT GTG AAA GAA GGC TAT ACT GGA TTC CAT ATG GGA	2372
Val Asp Thr Val Lys Glu Gly Tyr Thr Gly Phe His Met Gly	
510 515 520	
GCC TTC AAT GTT GAA GTATGTGATT TTACATCAAT TGTGTACTTG	2417
Ala Phe Asn Val Glu	
525	
TACATGGTCC ATTCTCGTCT TGATATACCC CTTGTTGCAT AAACATTAAC	2467
TTATTGCTTC TTGAATTTGG TTAG TGC GAT GTT GTT GAC CCA GCT	2512
Cys Asp Val Val Asp Pro Ala	
530	
GAT GTG CTT AAG ATA GTA ACA ACA GTT GCT AGA GCT C	2549
Asp Val Leu Lys Ile Val Thr Thr Val Ala Arg Ala	
535 540	

SEQ ID nr 3

Sekvenserad molekyl: genomiskt DNA

Namn: GBSS-genfragment från potatis

Sekvenslängd: 492 bp

GAG CTC TCC TGG AAG	GTAAGTGTGA ATTTGATAAT TTGCGTAGGT	45
Glu Leu Ser Trp Lys		
565		
ACTTCAGTTT GTTGTCTCG TCAGCACTGA TGGATTCCAA CTGGTGTCT		95
TGCAG	GAA CCT GCC AAG AAA TGG GAG ACA TTG	127
	Glu Pro Ala Lys Lys Trp Glu Thr Leu	
570	575	
CTA TTG GGC TTA GGA GCT TCT GGC AGT GAA CCC GGT GTT GAA		169
Leu Leu Gly Leu Gly Ala Ser Gly Ser Glu Pro Gly Val Glu		
580	585 590	
GGG GAA GAA ATC GCT CCA CTT GCC AAG GAA AAT GTA GCC ACT		211
Gly Glu Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Ala Thr		
595	600 605	
CCT TAA	ATGAGCTTTG GTTATCCTTG TTTCAACAAT AAGATCATTA	257
Pro ***		
606		
AGCAAACGTA TTTACTAGCG AACTATGTAG AACCTATTA TGGGGTCTCA		307
ATCATCTACA AAATGATTGG TTTTGTCTGG GGAGCAGCAG CATATAAGGC		357
TGTAAAATCC TGGTTAATGT TTTTGTAGGT AAGGGCTATT TAAGGTGGTG		407
TGGATCAAAG TCAATAGAAA ATAGTTATTA CTAACGTTTG CAACTAAATA		457
CTTAGTAATG TAGCATAAAT AATACTAGAA CTAGT		492

SEQ ID nr 4

Sekvenserad molekyl: genomiskt DNA

Namn: Promotor till GBSS-genen från potatis

Sekvenslängd: 987 bp

AAGCTTTAAC	GAGATAGAAA	ATTATGTTAC	TCCGTTTTGT	TCATTACTTA	50
ACAAATGCAA	CAGTATCTTG	TACCAAATCC	TTTCTCTCTT	TTCAAACTTT	100
TCTATTTGGC	TGTTGACGGA	GTAATCAGGA	TACAAACCAC	AAGTATTTAA	150
TTGACTCCTC	CGCCAGATAT	TATGATTTAT	GAATCCTCGA	AAAGCCTATC	200
CATTAAGTCC	TCATCTATGG	ATATACTTGA	CAGTATCTTC	CTGTTTGGGT	250
ATTTTTTTTT	CCTGCCAAGT	GGAACGGAGA	CATGTTATGA	TGTATACGGG	300
AAGCTCGTTA	AAAAAAAATA	CAATAGGAAG	AAATGTAACA	AACATTGAAT	350
GTTGTTTTTA	ACCATCCTTC	CTTTAGCAGT	GTATCAATTT	TGTAATAGAA	400
CCATGCATCT	CAATCTTAAT	ACTAAAATGC	AACCTTAATAT	AGGCTAAACC	450
AAGATAAAGT	AATGTATTCA	ACCTTTAGAA	TTGTGCATTC	ATAATTAGAT	500
CTTGTTTGTC	GTAAAAAATT	AGAAAATATA	TTTACAGTAA	TTTGGAATAC	550
AAAGCTAAGG	GGAAGTAAC	TAATATTCTA	GTGGAGGGAG	GGACCAGTAC	600
CAGTACCTAG	ATATTATTTT	TAATTACTAT	AATAATAATT	TAATTAACAC	650
GAGACATAGG	AATGTCAAGT	GGTAGCGTAG	GAGGGAGTTG	GTTTAGTTTT	700
TTAGATACTA	GGAGACAGAA	CCGGACGGCC	CATTGCAAGG	CCAAGTTGAA	750
GTCCAGCCGT	GAATCAACAA	AGAGAGGGCC	CATAATACTG	TCGATGAGCA	800
TTTCCCTATA	ATACAGTGTC	CACAGTTGCC	TTCTGCTAAG	GGATAGCCAC	850
CCGCTATTCT	CTTGACACGT	GTCAC TGAAA	CCTGCTACAA	ATAAGGCAGG	900
CACCTCCTCA	TTCTCACTCA	CTCACTCACA	CAGCTCAACA	AGTGGTAACT	950
TTTACTCATC	TCCTCCAATT	ATTTCTGATT	TCATGCA		987

SEQ ID nr 5

Sekvenserad molekyl: genomiskt DNA

Namn: GBSS-genen från potatis

Sekvenslängd: 4964 bp

AAGCTTTAAC	GAGATAGAAA	ATTATGTTAC	TCCGTTTTGT	TCATTACTTA	50
ACAAATGCAA	CAGTATCTTG	TACCAAATCC	TTTCTCTCTT	TTCAAACCTT	100
TCTATTTGGC	TGTTGACGGA	GTAATCAGGA	TACAAACCAC	AAGTATTTAA	150
TTGACTCCTC	CGCCAGATAT	TATGATTTAT	GAATCCTCGA	AAAGCCTATC	200
CATTAAGTCC	TCATCTATGG	ATATACTTGA	CAGTATCTTC	CTGTTTGGGT	250
ATTTTTTTTT	CCTGCCAAGT	GGAACGGAGA	CATGTTATGA	TGTATACGGG	300
AAGCTCGTTA	AAAAAAAATA	CAATAGGAAG	AAATGTAACA	AACATTGAAT	350
GTTGTTTTTA	ACCATCCTTC	CTTTAGCAGT	GTATCAATTT	TGTAATAGAA	400
CCATGCATCT	CAATCTTAAT	ACTAAAATGC	AACTTAATAT	AGGCTAAACC	450
AAGATAAAGT	AATGTATTCA	ACCTTTAGAA	TTGTGCATTC	ATAATTAGAT	500
CTTGTTTGTC	GTAAAAAATT	AGAAAATATA	TTTACAGTAA	TTTGGAATAC	550
AAAGCTAAGG	GGGAAGTAAC	TAATATTCTA	GTGGAGGGAG	GGACCAGTAC	600
CAGTACCTAG	ATATTATTTT	TAATTACTAT	AATAATAATT	TAATTAAACAC	650
GAGACATAGG	AATGTCAAGT	GGTAGCGTAG	GAGGGAGTTG	GTTTAGTTTT	700
TTAGATACTA	GGAGACAGAA	CCGGACGGCC	CATTGCAAGG	CCAAGTTGAA	750
GTCCAGCCGT	GAATCAACAA	AGAGAGGGCC	CATAATACTG	TCGATGAGCA	800
TTTCCCTATA	ATACAGTGTC	CACAGTTGCC	TTCTGCTAAG	GGATAGCCAC	850
CCGCTATTCT	CTTGACACGT	GTCAC TGAAA	CCTGCTACAA	ATAAGGCAGG	900
CACCTCCTCA	TTCTCACTCA	CTCACTCACA	CAGCTCAACA	AGTGGTAACT	950
TTTACTCATC	TCCTCCAATT	ATTTCTGATT	TCATGCATGT	TTCCCTACAT	1000
TCTATTATGA	ATCGTGTTGT	GGTGTATAAA	CGTTGTTTCA	TATCTCATCT	1050
CATCTATTCT	GATTTTGATT	CTCTTGCTTA	CTGTAATCGG	TGATAAATGT	1100
GAATGCTTCC	TTTCTTCTCA	GAAATCAATT	TCTGTTTTGT	TTTTGTTTCAT	1150
CTGTAGCTTA	TTCTCTGGTA	GATTCCCCTT	TTTGTAGACC	ACACATCAC	1199
ATG GCA AGC ATC ACA GCT TCA CAC CAC TTT GTG TCA AGA AGC					1241
Met Ala Ser Ile Thr Ala Ser His His Phe Val Ser Arg Ser					
1 5 10					
CAA ACT TCA CTA GAC ACC AAA TCA ACC TTG TCA CAG ATA GGA					1283
Gln Thr Ser Leu Asp Thr Lys Ser Thr Leu Ser Gln Ile Gly					
15 20 25					
CTC AGG AAC CAT ACT CTG ACT CAC AAT GGT TTA AGG GCT GTT					1325
Leu Arg Asn His Thr Leu Thr His Asn Gly Leu Arg Ala Val					
30 35 40					
AAC AAG CTT GAT GGG CTC CAA TCA ACA ACT AAT ACT AAG GTA					1367
Asn Lys Leu Asp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Asn Thr Lys Val					
45 50 55					
ACA CCC AAG ATG GCA TCC AGA ACT GAG ACC AAG AGA CCT GGA					1409
Thr Pro Lys Met Ala Ser Arg Thr Glu Thr Lys Arg Pro Gly					
60 65 70					
TGC TCA GCT ACC ATT GTT TGT GGA AAG GGA ATG AAC TTG ATC					1451
Cys Ser Ala Thr Ile Val Cys Gly Lys Gly Met Asn Leu Ile					
75 80					
TTT GTG GGT ACT GAG GTT GGT CCT TGG AGC AAA ACT GGT GGA					1493
Phe Val Gly Thr Glu Val Gly Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly					
85 90 95					

CTA GGT GAT GTT CTT GGT GGA CTA CCA CCA GCC CTT GCA	1532
Leu Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Leu Ala	
100 105 110	
GTAAGTCTTT CTTTCATTTG GTTACCTACT CATTTCATTAC TTATTTTGTT	1582
TAGTTAGTTT CTACTGCATC AGTCTTTTTC TCATTTAG GCC CGC GGA	1629
Ala Arg Gly	
CAT CGG GTA ATG ACA ATA TCC CCC CGT TAT GAC CAA TAC AAA	1671
His Arg Val Met Thr Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys	
115 120 125	
GAT GCT TGG GAT ACT GGC GTT GCG GTT GAG GTACATCTTC	1711
Asp Ala Trp Asp Thr Gly Val Ala Val Glu	
130 135	
CTATATTGAT ACGGTACAAT ATTGTTCTCT TACATTTCTT GATTCAAGAA	1761
TGTGATCATC TGCAG GTC AAA GTT GGA GAC AGC ATT GAA ATT GTT	1806
Val Lys Val Gly Asp Ser Ile Glu Ile Val	
140 145	
CGT TTC TTT CAC TGC TAT AAA CGT GGG GTT GAT CGT GTT TTT	1848
Arg Phe Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val Asp Arg Val Phe	
150 155 160	
GTT GAC CAC CCA ATG TTC TTG GAG AAA GTAAGCATAT	1885
Val Asp His Pro Met Phe Leu Glu Lys	
165 170	
TATGATTATG AATCCGTCCT GAGGGATACG CAGAACAGGT CATTTTGAGT	1935
ATCTTTTAAC TCTACTGGTG CTTTCTACTCT TTTAAG GTT TGG GGC AAA	1983
Val Trp Gly Lys	
175	
ACT GGT TCA AAA ATC TAT GGC CCC AAA GCT GGA CTA GAT TAT	2025
Thr Gly Ser Lys Ile Tyr Gly Pro Lys Ala Gly Leu Asp Tyr	
180 185	
CTG GAC AAT GAA CTT AGG TTC AGC TTG TTG TGT CAA	2061
Leu Asp Asn Glu Leu Arg Phe Ser Leu Leu Cys Gln	
190 195 200	
GTAAGTTAGT TACTCTTGAT TTTTATGTGG CATTTTACTC TTTTGTCTTT	2111
AATCGTTTTT TTAACCTTGT TTTCTCAG GCA GCC CTA GAG GCA CCT	2157
Ala Ala Leu Glu Ala Pro	
205	
AAA GTT TTG AAT TTG AAC AGT AGC AAC TAC TTC TCA GGA CCA	2199
Lys Val Leu Asn Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Phe Ser Gly Pro	
210 215 220	

TAT G	GTAATTAACA CATCCTAGTT TCAGAAACT CCTTACTATA	2243
Tyr G		
TCATTGTAGG TAATCATCTT TATTTTGCCT ATTCCTGCAG	GA GAG GAT	2291
	ly Glu Asp	
	225	
GTT CTC TTC ATT GCC AAT GAT TGG CAC ACA GCT CTC ATT CCT		2333
Val Leu Phe Ile Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Ile Pro		
	230 235	
TGC TAC TTG AAG TCA ATG TAC CAG TCC AGA GGA ATC TAC TTG		2375
Cys Tyr Leu Lys Ser Met Tyr Gln Ser Arg Gly Ile Tyr Leu		
	240 245 250	
AAT GCC AAG	GTAAAATTTTC TTTGTATTCA CTCGATTGCA	2414
Asn Ala Lys		
	255	
CGTTACCCTG CAAATCAGTA AGGTTGTATT AATATATGAT AAATTTTCACA		2464
TTGCCTCCAG GTT GCT TTC TGC ATC CAT AAC ATT GCC TAC CAA		2507
	Val Ala Phe Cys Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln	
	260 265	
GGT CGA TTT TCT TTC TCT GAC TTC CCT CTT CTC AAT CTT CCT		2549
Gly Arg Phe Ser Phe Ser Asp Phe Pro Leu Leu Asn Leu Pro		
	270 275 280	
GAT GAA TTC AGG GGT TCT TTT GAT TTC ATT GAT GGG TAT		2588
Asp Glu Phe Arg Gly Ser Phe Asp Phe Ile Asp Gly Tyr		
	285 290	
GTATTTATGC TTGAAATCAG ACCTCCAAC TTTGAAGCTC TTTTGATGCT		2638
AGTAAATTGA GTTTTTAAAA TTTTGCAGAT ATGAG AAG CCT GTT AAG		2685
	Lys Pro Val Lys	
	295	
GGT AGG AAA ATC AAC TGG ATG AAG GCT GGG ATA TTA GAA TCA		2727
Gly Arg Lys Ile Asn Trp Met Lys Ala Gly Ile Leu Glu Ser		
	300 305 310	
CAT AGG GTG GTT ACA GTG AGC CCA TAC TAT GCC CAA GAA CTT		2769
His Arg Val Val Thr Val Ser Pro Tyr Tyr Ala Gln Glu Leu		
	315 320 325	
GTC TCT GCT GTT GAC AAG GGA GTT GAA TTG GAC AGT GTC CTT		2811
Val Ser Ala Val Asp Lys Gly Val Glu Leu Asp Ser Val Leu		
	330 335 340	
CGT AAG ACT TGC ATA ACT GGG ATT GTG AAT GGC ATG GAT ACA		2853
Arg Lys Thr Cys Ile Thr Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Thr		
	345 350	

CAA GAG TGG AAC CCA GCG ACT GAC AAA TAC ACA GAT GTC AAA Gln Glu Trp Asn Pro Ala Thr Asp Lys Tyr Thr Asp Val Lys 355 360 365	2895
TAC GAT ATA ACC ACT GTAAGATAAG ATTTTTCCTGA CTCCAGTATA Tyr Asp Ile Thr Thr 370	2940
TACTAAATTA TTTTGTATGT TTATGAAATT AAAGAGTTCT TGCTAATCAA AATCTCTATA CAG GTC ATG GAC GCA AAA CCT TTA CTA AAG GAG Val Met Asp Ala Lys Pro Leu Leu Lys Glu 375 380	2990 3033
GCT CTT CAA GCA GCA GTT GGC TTG CCT GTT GAC AAG AAG ATC Ala Leu Gln Ala Ala Val Gly Leu Pro Val Asp Lys Lys Ile 385 390 395	3075
CCT TTG ATT GGC TTC ATC GGC AGA CTT GAG GAG CAG AAA GGT Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly 400 405 410	3117
TCA GAT ATT CTT GTT GCT GCA ATT CAC AAG TTC ATC GGA TTG Ser Asp Ile Leu Ala Val Ala Ile His Lys Phe Ile Gly Leu 415 420 425	3159
GAT GTT CAA ATT GTA GTC CTT GTAAGTACCA AATGGACTCA Asp Val Gln Ile Val Val Leu 430	3200
TGGTATCTCT CTTGTTGAGT TTACTTGTGC CGAAACTGAA ATTGACCTGC TACTCATCCT ATGCATCAG GGA ACT GGC AAA AAG GAG TTT GAG Gly Thr Gly Lys Lys Glu Phe Glu 435 440	3250 3293
CAG GAG ATT GAA CAG CTC GAA GTG TTG TAC CCT AAC AAA GCT Gln Glu Ile Glu Gln Leu Glu Val Leu Tyr Pro Asn Lys Ala 445 450	3335
AAA GGA GTG GCA AAA TTC AAT GTC CCT TTG GCT CAC ATG ATC Lys Gly Val Ala Lys Phe Asn Val Pro Leu Ala His Met Ile 455 460 465	3377
ACT GCT GGT GCT GAT TTT ATG TTG GTT CCA AGC AGA TTT GAA Thr Ala Gly Ala Asp Phe Met Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu 470 475 480	3419
CCT TGT GGT CTC ATT CAG TTA CAT GCT ATG CGA TAT GGA ACA Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu His Ala Met Arg Tyr Gly Thr 485 490 495	3461
GTAAGAACCA GAAGAGCTTG TACCTTTTTTA CTGAGTTTTT AAAAAAAGAA TCATAAGACC TTGTTTTCCA TCTAAAGTTT AATAACCAAC TAAATGTTAC TGCAGCAAGC TTTTCATTTT TGAAAATTGG TTATCTGATT TTAACGTAAT	3511 3561 3611

CACATGTGAG TCAG GTA CCA ATC TGT GCA TCG ACT GGT GGA CTT Val Pro Ile Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu 500 505	3655
GTT GAC ACT GTG AAA GAA GGC TAT ACT GGA TTC CAT ATG GGA Val Asp Thr Val Lys Glu Gly Tyr Thr Gly Phe His Met Gly 510 515 520	3697
GCC TTC AAT GTT GAA GTATGTGATT TTACATCAAT TGTGTACTTG Ala Phe Asn Val Glu 525	3742
TACATGGTCC ATTCTCGTCT TGATATACCC CTTGTTGCAT AAACATTAAC TTATTGCTTC TTGAATTTGG TTAG TGC GAT GTT GTT GAC CCA GCT Cys Asp Val Val Asp Pro Ala 530	3792 3837
GAT GTG CTT AAG ATA GTA ACA ACA GTT GCT AGA GCT CTT GCA Asp Val Leu Lys Ile Val Thr Thr Val Ala Arg Ala Leu Ala 535 540 545	3879
GTC TAT GGC ACC CTC GCA TTT GCT GAG ATG ATA AAA AAT TGC Val Tyr Gly Thr Leu Ala Phe Ala Glu Met Ile Lys Asn Cys 550 555 560	3921
ATG TCA GAG GAG CTC TCC TGG AAG GTAAGTGTGA ATTTGATAAT Met Ser Glu Glu Leu Ser Trp Lys 565	3965
TTGCGTAGGT ACTTCAGTTT GTTGTCTCTCG TCAGCACTGA TGGATTCCAA CTGGTGTTCT TGCAG GAA CCT GCC AAG AAA TGG GAG ACA TTG Glu Pro Ala Lys Lys Trp Glu Thr Leu 570 575	4015 4057
CTA TTG GGC TTA GGA GCT TCT GGC AGT GAA CCC GGT GTT GAA Leu Leu Gly Leu Gly Ala Ser Gly Ser Glu Pro Gly Val Glu 580 585 590	4099
GGG GAA GAA ATC GCT CCA CTT GCC AAG GAA AAT GTA GCC ACT Gly Glu Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Ala Thr 595 600 605	4141
CCT TAA ATGAGCTTTG GTTATCCTTG TTTCAACAAT AAGATCATTA Pro *** 606	4187
AGCAAACGTA TTTACTAGCG AACTATGTAG AACCCCTATTA TGGGGTCTCA	4237
ATCATCTACA AAATGATTGG TTTTGTGCTGG GGAGCAGCAG CATATAAGGC	4287
TGTA AAATCC TGGTTAATGT TTTTGTAGGT AAGGGCTATT TAAGGTGGTG	4337
TGGATCAAAG TCAATAGAAA ATAGTTATTA CTAACGTTTG CAACTAAATA	4387
CTTAGTAATG TAGCATAAAT AATACTAGAA CTAGTAGCTA ATATATATGC	4437
GTGAATTTGT TGTACCTTTT CTTGCATAAT TATTTGCAGT ACATATATAA	4487
TGAAAATTAC CCAAGGAATC AATGTTTCTT GCTCCGTCCT CCTTTGATGA	4537
TTTTTTACGC AATACAGAGC TAGTGTGTTA TGTTATAAAT TTTGTTTAAA	4587

AGAAGTAATC	AAATTCAAAT	TAGTTGTTTG	GTCATATGAA	AGAAGCTGCC	4637
AGGCTAACTT	TGAGGAGATG	GCTATTGAAT	TTCAAAATGA	TTATGTGAAA	4687
ACAATGCAAC	ATCTATGTCA	ATCAACACTT	AAATTATTGC	ATTTAGAAAG	4737
ATATTTTTGA	GCCCATGACA	CATTCATTCA	TAAAGTAAGG	TAGTATGTAT	4787
GATTGAATGG	ACTACAGCTC	AATCAAAGCA	TCTCCTTTAC	ATAACGGCAC	4837
TGTCTCTTGT	CTACTACTCT	ATTGGTAGTA	GTAGTAGTAA	TTTTACAATC	4887
CAAATTGAAT	AGTAATAAGA	TGCTCTCTAT	TTACTAAAGT	AGTAGTATTA	4937
TTCTTTCGTT	ACTCTAAAGC	AACAAAA			4964

PATENTKRAV

1. Förfarande för undertryckande av amylosbildning i
5 potatis, k ä n n e t e c k n a t av att potatisen för-
ändras gentekniskt genom att man i potatisvävnadens genom
inför en genkonstruktion omfattande ett fragment av den
potatisgen som kodar för bildning av stärkelsekornbundet
stärkelsesyntas (GBSS-genen) insatt i antisens-riktning,
10 vilket fragment är valt bland de fragment som har väsent-
ligen de nukleotidsekvenser som anges i SEQ ID nr 1, SEQ
ID nr 2 och SEQ ID nr 3 tillsammans med en promotor vald
bland CaMV 35S, patatin I och GBSS-promotorn.

2. Nativ stärkelse av amylopektintyp, k ä n n e -
15 t e c k n a d av att den erhållits från potatis som för-
ändrats gentekniskt för undertryckande av bildning av
stärkelse av amylostyp.

3. Derivatiserad stärkelse av amylopektintyp,
k ä n n e t e c k n a d av att den utgöres av stärkelse
20 av amylopektintyp som utvunnits ur potatis, vilken modi-
fierats gentekniskt för undertryckande av bildning av
stärkelse av amylostyp, vilken stärkelse av amylopektintyp
därefter har derivatiserats på kemisk, fysikalisk eller
enzymatisk väg.

25 4. Fragment av genen som kodar för stärkelsekornbun-
det stärkelsesyntas (GBSS) i potatis, vilket fragment är
valt bland de fragment som har väsentligen de nukleotid-
sekvenser som anges i SEQ ID nr 1, SEQ ID nr 2 och SEQ ID
nr 3.

30 5. Promotor till genen för stärkelsekornbundet stär-
kelsesyntas (GBSS) i potatis, vilken promotor är knölspe-
cifik och har väsentligen den nukleotidsekvens som anges i
SEQ ID nr 4.

35 6. Gen som kodar för stärkelsekornbundet stärkelse-
syntas i potatis (GBSS-genen) som har väsentligen den
nukleotidsekvens som anges i SEQ ID nr 5.

7. Antisens-konstruktion för inhibering av uttryck av genen för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas i potatis omfattande

a) en promotor,

- 5 b) ett fragment av genen som kodar för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas, insatt i antisens-riktning, vilket fragment är valt bland de fragment som har väsentligen de nukleotidsekvenser som anges i SEQ ID nr 1, SEQ ID nr 2 och SEQ ID nr 3.

- 10 8. Antisens-konstruktion enligt krav 7, k ä n n e - t e c k n a d av att promotorn har väsentligen den sekvens som anges i SEQ ID nr 4.

9. Antisens-konstruktion enligt krav 7, k ä n n e - t e c k n a d av att promotorn är vald bland CAMV 35S-
15 -promotorn och patatinI-promotorn.

10. Vektor omfattande ett fragment av den gen som kodar för stärkelsekornbundet stärkelsesyntas (GBSS) i potatis, vilket fragment är valt bland de fragment som har väsentligen de nukleotidsekvenser som anges i SEQ ID nr 1,
20 SEQ ID nr 2 och SEQ ID nr 3, och är insatt i antisens-riktning.

11. Vektor omfattande antisens-konstruktionen enligt något av kraven 7-9.

12. Cell av potatisplanta, vars genom omfattar anti-
25 sens-konstruktionen enligt något av kraven 7-9.

13. Potatisplanta, vars genom omfattar antisens-konstruktionen enligt något av kraven 7-9.

14. Potatisknölar, vilkas genom omfattar antisens-konstruktionen enligt något av kraven 7-9.

- 30 15. Frön från potatisplanta, vilkas genom innehåller antisens-konstruktionen enligt något av kraven 7-9.

16. Mikroknölar av potatis, vilkas genom omfattar antisens-konstruktionen enligt något av kraven 7-9.

SAMMANDRAG

5 Genteknisk förändring av potatis för undertryckande av bildning av stärkelse av amylostyp beskrivs.

Tre fragment för insättning i antisensriktning i potatisgenomet beskrivs också. Vidare beskrivs antisens-konstruktioner, gener och vektorer omfattande nämnda antisens-fragment. Likaså beskrivs en promotor till genen som kodar för bildning av stärkelsekornbundet stärkelsesyntas och även själva genen.

Även celler, plantor, knölar, mikroknölar och frön av potatis omfattande nämnda antisens-fragment beskrivs.

15 Slutligen beskrivs stärkelse av amylopektintyp, både nativ och derivatiserad, härrörande från den gentekniskt förändrade potatisen, liksom ett förfarande för undertryckande av amylosbildning i potatis.

20

25

30

35